

На правах рукописи

Чернова Екатерина Владимировна

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ
ВИЛЛЕБРАНДА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

14. 01.21 Гематология и переливание крови

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Колосков Андрей Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им И.И. Мечникова Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Богданов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры последипломного медицинского образования ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации.

Мартынкевич Ирина Степановна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

Защита состоится «__» _____ 2020 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.090.01 при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8, тел.: 8(812)338-71-04, e-mail: usovet@spb-gmu.ru) в зале заседаний Ученого Совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России и на сайте: <http://1spbgmu.ru>
Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



Марченко Валерий Николаевич

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Стратификация тромботических и геморрагических рисков важная и часто каждодневная задача для врачей различных специальностей. Широкое внедрение в клиническую практику антикоагулянтной и антиагрегантной терапии позволило, с одной стороны, добиться значительных успехов в лечении и профилактике тромбозов и тромбоэмболических осложнений, но, с другой стороны, создало риск развития спонтанных и/или трудно контролируемых кровотечений.

Наиболее распространенной геморрагической коагулопатией является болезнь Виллебранда – наследственное нарушение гемостаза, обусловленное количественным и/или качественным дефицитом фактора Виллебранда, одного из важнейших белков свертывающей системы крови. Клинической особенностью болезни Виллебранда является «мягкий» и «спонтанный» характер геморрагического диатеза: в определенные моменты времени признаки чрезмерной кровоточивости могут не проявляться даже при инвазивных манипуляциях, а иногда можно столкнуться с развитием спонтанного кровотечения из внешне интактных слизистых. Известен факт развитие геморрагического диатеза, иногда значительного, у пациентов с болезнью Виллебранда в ответ на назначение малых доз ацетилсалициловой кислоты, что хорошо объясняется наличием у пациентов с болезнью Виллебранда дисфункции тромбоцитов. Отсутствие обязательных, часто повторяющихся тяжелых кровотечений у индивидуума с болезнью Виллебранда нередко не позволяет врачам своевременно распознать это заболевание. (Колосков А.В., 2017; Чернова Е.В., 2018).

В последние годы большое внимание уделяется изучению полиморфизма генов фактора V G1691A (FV Leiden), протромбина G20210A (FII G20210A), тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) с целью стратификации риска тромбоэмболических осложнений и/или репродуктивных проблем у женщин, для объяснения патогенеза которых предлагается тромботический механизм (Bates S. et al., 2012). В тоже время, описано несколько случаев носительства гетерозиготных мутаций гена фактора V G1691A (FVLeiden) или гена протромбина G20210A (FII G20210A) у пациенток с болезнью Виллебранда и достаточно яркими проявлениями геморрагического диатеза (Колосков А.В. и др., 2013).

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным выполнить исследование частоты встречаемости основных генетических полиморфизмов, ассоциируемых с тромбофилией (V G1691A (FV Leiden) и G20210A (FII G20210A)), а также частоту встречаемости полиморфизмов генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) и изучить их возможное влияние на проявления геморрагического диатеза и лабораторные показатели у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Цель исследования

Оценить частоту встречаемости и клиническое значение основных генетических полиморфизмов, ассоциируемых с тромбофилией (FV Leiden и FII G20210A), и полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов GPIb (A1/A2), интегрин α -2 GPIa (C807T), GPIIb (1a/1b) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Задачи исследования

1. Изучить методом полимеразной цепной реакции и оценить частоту встречаемости полиморфизма G1691A гена фактора V (FV Leiden) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и сопоставить с частотой встречаемости данного полиморфизма в контрольной группе здоровых доноров крови.

2. Выполнить клиничко-лабораторное сопоставление и оценить влияние полиморфизма гена G1691A фактора V (FV Leiden) на степень выраженности клинических проявлений геморрагического диатеза и лабораторные характеристики свертывающей системы крови (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

3. Изучить методом полимеразной цепной реакции и оценить частоту встречаемости полиморфизма G20210A гена протромбина у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и сопоставить с частотой встречаемости данного полиморфизма в контрольной группе здоровых доноров крови.

4. Выполнить клиничко-лабораторное сопоставление и оценить влияние полиморфизма G20210A гена протромбина на степень выраженности геморрагического диатеза и лабораторные характеристики свертывающей системы крови (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

5. Изучить методом полимеразной цепной реакции и оценить частоту встречаемости полиморфизмов генов тромбоцитарных рецепторов GPIb (A1/A2), интегрин α -2 GPIa (C807T), GPIIb (1a/1b) и сопоставить с частотой встречаемости данного полиморфизма в контрольной группе здоровых доноров крови. Провести сопоставление клинических и лабораторных данных в зависимости от генетических полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Научная новизна исследования

Установлено, что у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, гомозиготная мутация гена фактора V G1691A (FV Leiden) генотип A/A встречается с частотой 2,2%, гетерозиготная мутация гена фактора V G1691A (FV Leiden) генотип A/G-8,8%, гетерозиготная мутация гена протромбина G20210A, генотип A/G встречается с частотой 13,9%, что достоверно выше по сравнению с группой контроля. При этом достоверной разницы в степени геморрагических проявлений, уровня активности фактора Виллебранда (vWF:RCo), антигена фактора Виллебранда (vWF:Ag) и прокоагулянтной активности фактора VIII (FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда нет.

Как показали результаты нашего исследования, частота встречаемости наиболее широко обсуждаемых в научной литературе полиморфизмов генов

тромбоцитарных рецепторов GPIIb (1a/1b), интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с диагностированной болезнью Виллебранда 1 типа не имела статистически значимых различий с таковой у здоровых женщин – доноров крови. При этом генотип 1a-1b гена тромбоцитарного рецептора GPIIb, частота встречаемости которого у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа составила 23,5%, что оказалась достоверно выше по сравнению с частотой встречаемости данного генотипа у здоровых женщин. Статистически значимых различий в клинических и лабораторных показателях (vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C), у женщин с болезнью Вилебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма генов, кодирующих тромбоцитарные рецепторы GPIIb, GPIa и GPIb не выявлены.

Практическая значимость исследования

Впервые на большой и нозологически однородной группе пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, продемонстрирована высокая частота встречаемости гомозиготной мутации гена фактора V G1691A (FV Leiden) (генотип A/A) и гетерозиготной мутации (генотип A/G) – 2,2% и 8,8% (соответственно), а также высокая частота встречаемости гетерозиготной мутации гена протромбина (G20210A) (генотип A/G) - 13,9%. Данные показатели были достоверно выше по сравнению с аналогичными, исследованными в группе здоровых женщин - доноров крови.

Впервые при выполнении клинико-лабораторного сопоставления продемонстрировано, что носительство гомозиготной или гетерозиготной мутации FV Leiden, а также гетерозиготной мутации FII G20210A не уменьшало выраженность клинических проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, а также не оказывало какого-либо влияния на лабораторные характеристики основных свертывающих факторов, такие как антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag), ристоцетин ко-факторная активность фактора Виллебранда (vWF:RCo) и прокагулянтную активность фактора VIII (FVIII:C).

Впервые продемонстрировано, что частота встречаемости полиморфизмов генов тромбоцитарных рецепторов GPIIb (1a/1b), интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с диагностированной болезнью Виллебранда 1 типа не имела статистически значимых различий с таковой у здоровых женщин – доноров крови и является широко распространенным явлением, не оказывающим какого-либо видимого влияния на степень выраженности геморрагического диатеза и лабораторные характеристики основных свертывающих факторов, такие как антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag), ристоцетин ко-факторная активность фактора Виллебранда (vWF:RCo) и прокагулянтную активность фактора VIII (FVIII:C). При этом генотип 1a-1b гена тромбоцитарного рецептора GPIIb, частота встречаемости которого у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа составила 23,5%, что было достоверно выше по сравнению с частотой встречаемости данного генотипа у здоровых женщин-доноров крови, но также не оказывало какого-

либо влияния на клинические проявления геморрагического диатеза и лабораторные показатели.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинико-лабораторные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что полиморфизм G1691A гена фактора V (FV Leiden) встречается у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа с частотой 8,8% для гетерозиготного варианта и частотой 2,2% для гомозиготного варианта, что превышает частоту встречаемости данного полиморфизма в контрольной группе здоровых доноров крови (1,8% для гетерозиготного варианта, гомозиготной мутации в контрольной группе здоровых доноров крови не выявлено).

2. Носительство как гетерозиготного, так и гомозиготного варианта мутации Лейден не оказывает видимого протромботического эффекта у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, не уменьшает степень выраженности геморрагического диатеза и не влияет на такие показатели свертывающей системы крови, как vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C.

3. Установлено, что полиморфизм G20210A гена протромбина встречается у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в гетерозиготном варианте с частотой 13,9%, что значительно превышает частоту встречаемости данного полиморфизма в контрольной группе здоровых доноров крови (2,7%).

4. Носительство гетерозиготной мутации G20210A гена протромбина не оказывает видимого протромботического эффекта у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, не уменьшает степень выраженности геморрагического диатеза и не влияет на такие показатели свертывающей системы крови, как vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C.

5. Полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), гена интегрин α -2 GPIa (C807T), GPIb (A1/A2) широко представлен как у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, так и у лиц контрольной группы здоровых доноров. Не выявлено корреляционной связи между исследованными полиморфизмами, лабораторными характеристиками гемостаза и выраженностью клинических проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Степень достоверности, публикации и апробация результатов

Степень достоверности результатов выполненного исследования подтверждается объемом исследований, набором и характером оцениваемых показателей, использованием статистических программ для обработки полученных данных.

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.

Результаты, полученные в процессе выполнения работы, были представлены на 91 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Мечниковские чтения (Санкт-Петербург, 2018), объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 9-й Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Санкт-Петербург, 2018).

Личный вклад автора

Автором лично выполнено: изучение источников литературы, планирование научно-исследовательской работы, обследование пациенток с болезнью Виллебранда, обследование здоровых женщин – доноров крови контрольной группы, апробация опросника для изучения геморрагического и тромботического диатеза, забор образцов крови для молекулярно-генетического исследования. Соискателем создана база данных пациенток с болезнью Виллебранда, выполнен сбор и анализ полученных в ходе диссертационного исследования результатов, проведена статистическая обработка и интерпретация результатов. Диссертант лично докладывала результаты научно-исследовательской работы в выступлениях на научно-практических конференциях и участвовала в написании научных публикаций.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования, заключения, практических рекомендаций и библиографии. Список литературы включает 120 источников литературы, из них 22 отечественных и 98 иностранных. Работа содержит 1 рисунок и 13 таблиц.

Внедрение результатов исследования

Основные положения научно-исследовательской работы внедрены в учебный процесс кафедры гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ. Результаты исследования применяются в лечебно-диагностической работе СПб ГБУЗ «Городская больница №26».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика групп исследуемых

В исследование включено 136 женщин с болезнью Виллебранда 1 типа в возрасте от 18 до 45 лет (медиана возраста составила 31,7 ($\pm 5,5$) лет). Группа контроля сформирована из здоровых женщин - доноров крови отделения переливания крови СПб ГБУЗ «Городская больница №26». В контрольную группу включены женщины в возрасте от 18 до 42 лет, медиана возраста составила 30 ($\pm 6,1$) лет, без кровотечений и тромбозов в анамнезе. Пациентки с болезнью Виллебранда и здоровые женщины - доноры крови, составившие контрольную группу, были сопоставимы возрасту.

Методы исследования

Болезнь Виллебранда диагностирована на основании национального протокола (Зозуля Н.И. и др., 2018). Изучение личного геморрагического и тромботического анамнеза у лиц, включенных в исследование, выполнено с использованием разработанного на основании международного (Sadler JE et al., 2005; Rodeghiero F et al., 2005; Lee CA et al., 2006; Rydz N et al., 2012) и нашего личного опыта опросника (Колосков А.В. и др., 2013; Колосков А.В. и др., 2018) для оценки признаков чрезмерной кровоточивости (Колосков А.В. и др., 2013; Колосков А.В. и др., 2018).

В опросник для изучения геморрагического диатеза входят следующие вопросы:

1. Легко ли образуются синяки?
2. Бывают ли сейчас или были ли ранее носовые кровотечения (если да, то в каком возрасте и как часто)?
3. Было ли кровотечение при удалении зубов (если да, то какова длительность кровотечения)?
4. Есть ли кровоточивость десен?
5. Бывает ли кровотечение при бытовых ранениях и царапинах (если да, то какова длительность)?
6. Было ли обильное кровотечение во время первых месячных?
7. Есть ли боль во время овуляции?
8. Оценка объема менструальной кровопотери с использованием описательного метода, учитывающего количество и наполняемость использованных гигиенических прокладок и/или тампонов. За одну полностью пропитанную прокладку начисляли 20 баллов; прокладка, пропитанная частично — 10 баллов. Полностью пропитанный тампон — 10 баллов; частично пропитанный тампон — 5 баллов. При наличии сгустков крови диаметром более 2,5 см (диаметр современной монеты достоинством 5 рублей) начисляли дополнительно 5 баллов, при наличии протекания крови через прокладку или тампон — дополнительно 40 баллов (Колосков А.В. и др., 2018).

Для включения в исследование пациенток с болезнью Виллебранда необходимым условием было наличие не менее трех положительных ответов на вопросы с 1 по 7 или минимум два положительных ответа на вопросы с 1 по 7 и не менее 100 баллов по результатам оценки объема менструальной кровопотери. Самостоятельным критерием включения являлся результат 180 баллов и более при оценке объема менструальной кровопотери (Колосков А.В. и др., 2018).

У пациенток и женщин из группы контроля исследовали vWF:RCo, vWF:Ag и фактор VIII (FVIII:C), определяли соотношение vWF:RCo/vWF:Ag. В качестве дополнительных тестов оценивали агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, ристомидином и коллагеном (Колосков А.В. и др., 2018; Чернова Е.В. и др., 2019). Исследования vWF:RCo, vWF:Ag и FVIII:C проводили на автоматическом коагулометре Elite PRO (Instrumentation Laboratory, США) с использованием реагентов HemosiIL (Instrumentation Laboratory, США). Исследование агрегации тромбоцитов выполняли по методу

Борна с помощью анализатора агрегации тромбоцитов АТ-02 (Россия) с использованием агрегирующих агентов АДФ, коллагена и ристомицина (Колосков А.В. и др., 2018; Чернова Е.В. и др., 2019).

Выполняли молекулярно-генетическое исследование полиморфизма гена фактора V G1691A (FVLeiden), гена протромбина (FII G20210A), гена тромбоцитарного рецептора GPIb (A1/A2), гена интегрина α -2 GPIa (C807T) и гена тромбоцитарного рецептора GPIIb (1a/1b) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в полиакриламидном геле (Колосков А.В. и др., 2018; Чернова Е.В. и др., 2019).

В качестве материала для исследования использовалась периферическая кровь женщин с болезнью Виллебранда и женщин - доноров крови.

Статистические методы исследования

Статистическая обработка материала проведена с помощью программы Statistika for Windows, v.10 (StatSoft, США). Вычислены дескриптивные характеристики для каждой группы обследованных лиц: частота встречаемости признака, среднее значение показателя (M), стандартное отклонение (SD), ошибка среднего (m), минимум, максимум.

Прямым подсчетом определяли частоты встречаемости генотипов.

Точный критерий Фишера использовался для оценки степени различий в ЧВ генотипов, лабораторных и клинических данных между группой пациенток с болезнью Виллебранда и группой контроля, при сравнении групп с определенным генетическим полиморфизмом у пациенток с болезнью Виллебранда. С помощью критерия хи-квадрат определяли соответствие распределения генотипов в обследованных группах каноническому распределению Харди-Вайнберга.

Во всех случаях статистическая значимость различий принималась при значении $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Частота встречаемости полиморфизма FV Leiden у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови.

Как продемонстрировали результаты выполненного исследования, представленные в таблице 1, у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, гетерозиготная и гомозиготная мутации FV Leiden не является уникальным явлением. Общая частота встречаемости этого полиморфизма (гетерозиготный и гомозиготный вариант) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа составила 11 %, что значительно превышало частоту встречаемости обсуждаемого полиморфизма у здоровых женщин – доноров крови (1,8%).

Таблица 1. Частота встречаемости полиморфизма гена фактора V (FV Leiden) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови (контрольная группа)

Ген, полиморфизм	Генотип	Пациентки с болезнью Виллебранда 1 типа (n=136)	Контрольная группа (n=111)	p
Ген фактора V (A1691G)	A/G	12 (8,8%)	2 (1,8%)	0,03
	A/A	3 (2,2%)	0	0,05
	G/G	121 (88,9%)	109 (98%)	

Частота встречаемости полиморфизма FII (G20210A) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, гетерозиготная мутация FII G20210A (генотип A/G) выявлена у 19 пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа (13,9 % от всех пациенток исследованной группы). В нашем исследовании гомозиготная мутация FII G20210A (генотип A/A) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа не обнаружена. Соответственно, полиморфизм гена FII G20210A (генотип G/G) выявлен у 117 пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа (86% от всех пациенток исследованной группы).

В контрольной группе у здоровых женщин – доноров крови гетерозиготная мутация FII G20210A (генотип A/G) выявлена у 3 женщин (2,7% от всех лиц контрольной группы). Гомозиготная мутация FII G20210A (генотип A/A) у здоровых женщин – доноров крови в нашем исследовании не выявлена. Соответственно, у 108 женщин (97,3% от всех лиц контрольной группы) мутация гена FII G20210A отсутствовала.

Таблица 2. Частота встречаемости полиморфизма FII G20210A у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови (контрольная группа).

Ген, полиморфизм	Генотип	Пациентки с болезнью Виллебранда 1 типа (n=136)	Контрольная группа (n=111)	p
Ген протромбина (G20210A)	A/G	19 (13,9 %)	3 (2,7%)	0,005
	A/A	0	0	
	G/G	117 (86,1 %)	108 (97,3%)	

Полученные в исследовании результаты продемонстрировали неожиданно высокую частоту встречаемости гетерозиготная мутация FII G20210A у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа (13,9 % от всех пациенток исследованной группы), что было на порядок выше, чем у здоровых женщин – доноров крови контрольной группы (2,7 %).

Влияние полиморфизма FV Leiden на активность клоттинговых факторов (vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Уровень антигена фактора Виллебранда (vWF:Ag), ристоцитин ко-факторной активности (vWF:RCo), прокагулянтной активности фактора VIII (FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, носительниц гетерозиготной и гомозиготной мутации FV Leiden и показатели клоттинговой активности у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющихся носительницами мутации FV Leiden представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели клоттинговой активности vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C в зависимости от полиморфизма гена фактора V у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Ген, полиморфизм	Генотип	vWF:Ag (M ±SD)	vWF:RCo (M ±SD)	FVIII:C (M ±SD)
Ген фактора V (A1691G)	A/G (n=12)	38,3 ± 7,1 %	37,3 ± 6,5 %	44,1 ± 5,2 %
	A/A (n=3)	42 ± 3,0 %	42,6 ± 2,5 %	46,6 ± 1,5 %
	G/G (n=121)	40 ± 6,5 %	40,6 ± 6,1%	42,6 ± 5,7 %

Где * p=0,05.

При сопоставлении полученных результатов исследования клоттинговой активности у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, являющихся носительницами гетерозиготной или гомозиготной мутации FV Leiden и у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющихся носителями этой мутации, достоверных отличий между показателями vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C не выявлено.

Влияние полиморфизма FII G20210A на активность клоттинговых факторов (vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

В таблице 4 представлен уровень активности клоттинговых факторов-vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, носительниц гетерозиготной мутации FII G20210A (генотип A/G) и пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющимися носительницами мутации FII G20210A (генотип дикого типа G/G).

Таблица 4. Показатели клоттинговой активности vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C в зависимости от полиморфизма FII G20210A у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа

Ген, полиморфизм	Генотип	vWF:Ag (M ±SD)	vWF:RCo (M ±SD)	FVIII:C (M ±SD)
Ген протромбина (G20210A)	A/G (n=19)	43 ± 5,6 %	43 ± 4,9 %	45,1 ± 5,6 %
	G/G (n=117)	44 ± 5,7 %	41 ± 6,5 %	42,6 ± 6,0 %

Где * p=0,05.

При сопоставлении полученных результатов исследования клоттинговой активности у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, являющихся носительницами гетерозиготной мутации FII G20210A и у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющихся носителями этой мутации, достоверных отличий между показателями vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C не выявлено.

Влияние полиморфизма FV Leiden на клинические проявления геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

С целью выявления возможного прокоагулянтного эффекта мутации FV Leiden на реализацию геморрагического фенотипа у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа с генотипом G/G (дикий тип, мутация FV Leiden отсутствует) (n=121) проанализированы жалобы пациенток на чрезмерную кровоточивость (таблица 5).

Таблица 5. Частота встречаемости и выраженность проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма гена фактора V - FV Leiden

Симптом	Вариант полиморфизма гена фактора V (A1691G)		
	G/G (n=121)	A/G (n=12)	A/A (n=3)
синяки	96 (79,3%)	12 (100%)	3 (100%)
носовые кровотечения	84 (69,4 %)	10 (83,3%)	3 (100%)
кровотечения при удалении зубов	69 (57,0%)	5 (41,6%)	0
кровотечения из десен	70 (57,8%)	10 (83,3%)	0
кровотечения при ранениях	84 (69,4%)	2 (16,6%)	1 (33,3%)
ювенильные кровотечения	30 (24,7%)	2 (16,6%)	0

Продолжение таблицы 5.

боль в середине менструального цикла	60 (49,5%)	2 (16,6%)	0
геморрагическая наследственность	36 (29,7%)	2 (16,6%)	0
объем менструальной кровопотери (баллы)	256 ± 15,2	242 ± 14,5	247 ± 4,6

Где * $p=0,05$.

При статистическом анализе полученных данных достоверных различий между исследованными группами не выявлено, в том числе по такому значимому показателю, как объем менструальной кровопотери.

Изучение влияния полиморфизма FII (G20210A) на клинические проявления геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

С целью выявления возможного прокоагулянтного эффекта мутации FII (G20210A) на реализацию геморрагического фенотипа у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа с генотипом G/G (дикий тип) (n=117) проанализированы жалобы пациенток на чрезмерную кровоточивость (таблица 6).

Таблица 6. Частота встречаемости и выраженность проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма FII (G20210A)

Симптом	Вариант полиморфизма гена протромбина (G20210A)	
	G/G (n=117)	A/G (n=19)
синяки	96 (82,0 %)	15 (78,9 %)
носовые кровотечения	86 (73,5 %)	12 (63,1 %)
кровотечения при удалении зубов	60 (51,3 %)	9 (47,3 %)
кровотечения из десен	58 (49,6 %)	6 (31,6 %)
кровотечения при ранениях	59 (50,4 %)	8 (42,1 %)
ювенильные кровотечения	26 (22,2 %)	4 (21,0 %)
боль в середине менструального цикла	50 (42,7 %)	7 (36,8 %)
геморрагическая наследственность	26 (22,2 %)	3 (15 %)

Продолжение таблицы 6.

объем менструальной кровопотери (баллы)	250 ± 10,5	240 ± 10,2
---	------------	------------

Где * p=0,05.

При статистическом анализе полученных данных достоверных различий между исследованными группами не выявлено, в том числе по такому значимому показателю, как объем менструальной кровопотери. Таким образом, представляется возможным сделать вывод о том, что

Частота встречаемости полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), гена интегрин α-2 GPIa (C807T), GPIb (A1/A2) и их влияние на активность клоттинговых факторов (vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови.

В таблице 7 представлены результаты частоты встречаемости полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α-2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови.

Таблица 7. Частота встречаемости полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α-2GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и у здоровых женщин – доноров крови (контрольная группа)

Ген, полиморфизм	Генотип	Пациентки с болезнью Виллебранда 1 типа (n=136)	Контрольная группа (n=111)
GPIIa (1a/1b)	1a/1a	100 (73,5%)	96 (86,4%)
	1b/1b	4 (2,9%)	3 (2,7%)
	1a/1b	32 (23,5%) *	12 (10,8%)
интегрин α-2GPIa (C807T)	C-C	72 (52,9%)	45 (40,9%)
	C-T	44 (32,3%)	47 (42,7%)
	T-T	20 (14,7%)	18 (16,3%)
GPIb (A1/A2)	A1/A1	131 (96,3%)	107 (96,4%)
	A1/A2	5 (3,6%)	4 (3,6%)

Где* p = 0,05

В таблице 8 представлены показатели клоттинговой активности vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C в зависимости от полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α-2GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

Таблица 8. vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C в зависимости от полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α -2GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа

Ген, полиморфизм	генотип	vWF:Ag (M \pm SD)	vWF:RCo (M \pm SD)	FVIII:C (M \pm SD)
GPIIa (1a/1b)	1a/1a	40,5 \pm 7,5 %	40,0 \pm 6,0 %	41,0 \pm 6,7 %
	1b/1b	40,5 \pm 7,2 %	42,5 \pm 5,8 %	42,5 \pm 6,2 %
	1a/1b	38,5 \pm 9,5 %	35,7 \pm 8,2 %	36,2 \pm 7,3 %
интегрин α -2GPIa (C807T)	C-C	38,5 \pm 7,3 %	39,0 \pm 5,5 %	41,5 \pm 7,2 %
	C-T	38,5 \pm 8,3 %	35,0 \pm 6,2 %	38,0 \pm 8,2 %
	T-T	38,2 \pm 6,2 %	37,4 \pm 5,0 %	42,0 \pm 5,5 %
GPIb (A1/A2)	A1/A1	45,0 \pm 8,0 %	40,0 \pm 6,0 %	41,0 \pm 6,0 %
	A1/A2	44,0 \pm 7,0 %	44,0 \pm 7,0 %	43,8 \pm 6,8 %

Где * p=0,05.

При выполнении статистического анализа выявлено достоверное различие в частоте встречаемости полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIIa (генотип 1a/1b) по сравнению с группой контроля, у женщин с болезнью Виллебранда (p=0,05). При этом достоверных различий в частоте встречаемости других полиморфизмов изучаемых генов тромбоцитарных рецепторов не обнаружено, изученные полиморфизмы практически с одинаковой частотой встречаются как у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, так и у здоровых женщин – доноров крови.

Несмотря на достоверно большую частоту встречаемости полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIIa (генотип 1a/1b) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, по сравнению со здоровыми женщинами – донорами крови, не выявлено какого-либо влияния данного полиморфизма, как и всех остальных изученных полиморфизмов генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α -2GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2), на такие показатели свертывающей системы крови, как vWF:Ag, vWF:RCo и FVIII:C.

Влияние полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), гена интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) на клинические проявления геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

С целью выявления возможного прокоагулянтного эффекта полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов был выполнен анализ частоты и выраженности проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, в зависимости от имеющихся у них полиморфизмов изучаемых генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), интегрин α -2GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) (таблица 9, 10, 11).

Таблица 9. Частота встречаемости и выраженность проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIIa (1a/1b)

Жалобы	Вариант полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIIa (1a/1b)		
	1a/1a (n=100)	1b/1b (n=4)	1a/1b (n=32)
синяки	85 (85,0%)	2 (50,0%)	22 (68,7%)
носовые кровотечения	80 (80,0%)	3 (75,0%)	15 (46,8%)
кровотечения при удалении зубов	61 (61,0%)	1 (25,0%)	13 (40,0%)
кровотечения из десен	34 (34,0%)	2 (50,0%)	18 (56,2%)
кровотечения при ранениях	59 (59,0%)	2 (50,0%)	29 (90,6%)
ювенильные кровотечения	21 (21,0%)	2 (50,0%)	7 (21,8%)
боль в середине менструального цикла	48 (48,0%)	2 (50,0%)	11 (34,3%)
геморрагическая наследственность	36 (36,0%)	0,0	3 (9,3%)
объем менструальной кровопотери (баллы)	256 ± 15,2	252 ± 3,2	248 ± 9,3

Где * p=0,05.

Таблица 10. Частота встречаемости и выраженность проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора интегрин α -2GPIa (C807T)

Жалобы	Вариант полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора интегрин α -2GPIa (C807T)		
	C-C (n=72)	C-T (n=44)	T-T (n=20)

Продолжение таблицы 10.

синяки	51 (70,8%)	37 (84,0%)	20 (100%)
носовые кровотечения	51 (70,8%)	36 (81,8%)	10 (50,0%)
кровотечения при удалении зубов	34 (47,2%)	28 (63,6%)	12 (60,0%)
кровотечения из десен	46 (63,8%)	30 (68,1%)	16 (80,0%)
кровотечения при ранениях	45 (62,5%)	28 (63,6%)	16 (80,0%)
ювенильные кровотечения	21 (29,1%)	10 (22,7%)	2 (10,0%)
боль в середине менструального цикла	24 (33,3%)	25 (56,8%)	12 (60,0%)
геморрагическая наследственность	8 (11,1%)	22 (50,0%)	8 (40,0%)
объем менструальной кровопотери (баллы)	260 ± 13,5	255 ± 10,2	263 ± 8,2

Где * p=0,05

Таблица 11. Частота встречаемости и выраженность проявлений геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа в зависимости от полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIb (A1/A2)

Жалобы	Вариант полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора GPIb (A1/A2)	
	A1/A1 (n=131)	A1/A2 (n=5)
синяки	106 (80,9%)	5 (100%)
носовые кровотечения	97 (74,0%)	5 (100%)
кровотечения при удалении зубов	70 (53,4%)	5 (100%)

Продолжение таблицы 11.

кровотечения из десен	83 (63,3%)	2 (40,0%)
кровотечения при ранениях	85 (64,8%)	5 (100%)
ювенильные кровотечения	28 (21,3%)	0,0
боль в середине менструального цикла	57 (43,5%)	5 (100%)
геморрагическая наследственность	36 (27,4%)	3 (60,0%)
объем менструальной кровопотери (баллы)	254 ± 13,2	249 ± 4,8

Где * p=0,05

При статистическом анализе полученных данных достоверных различий между исследованными группами не выявлено, в том числе по значимому показателю-объем менструальной кровопотери. Таким образом, представляется возможным сделать вывод о том, что носительство различных вариантов полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), гена интегрин α -2 GPIa (C807T) и GPIb (A1/A2) не оказывает влияния на частоту встречаемости и выраженность симптомов геморрагического диатеза у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа.

ВЫВОДЫ

1. Встречаемость гетерозиготного и гомозиготного варианта полиморфизма G1691A гена фактора V (FV Leiden) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа не является уникальной ситуацией. Частота встречаемости обоих вариантов данного полиморфизма оказалась достоверно выше данного показателя для контрольной группы здоровых женщин - доноров крови.

2. Носительство как гетерозиготной, так и гомозиготной мутации G1691A гена фактора V (FV Leiden) не приводит к снижению степени выраженности основных геморрагических симптомов, в том числе объема менструальной кровопотери, а также не оказывает влияния на основные количественные и качественные лабораторные характеристики, оценивающие функцию фактора Виллебранда (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа по сравнению с пациентками с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющимися носительницами данной мутации.

3. Гетерозиготная мутации G20210A гена протромбина встречается у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа с частотой 13,9 %, что значительно

превышает частоту встречаемости данного полиморфизма по сравнению с контрольной группой здоровых женщин - доноров крови.

4. Носительство гетерозиготной мутации G20210A гена протромбина не приводит к снижению степени выраженности основных геморрагических симптомов, в том числе объема менструальной кровопотери, а также не оказывает влияния на основные количественные и качественные лабораторные характеристики фактора Виллебранда (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа по сравнению с пациентками с болезнью Виллебранда 1 типа, не являющимися носительницами данной мутации.

5. Полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов GPIIa (1a/1b), гена интегрина α -2 GPIa (C807T), GPIb (A1/A2) широко распространен как среди пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, так и среди женщин – здоровых доноров крови, при этом не установлено каких либо корреляционных связей между вариантами данных полиморфизмов и клинико-лабораторными характеристиками пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, не выявлено влияния данных полиморфизмов на выраженность геморрагического диатеза у пациенток в исследованных группах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В связи с достаточно высокой частотой встречаемости гомозиготного и гетерозиготного вариантов полиморфизма G1691A гена фактора V (FV Leiden) у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа с клинически значимыми проявлениями геморрагического диатеза, данный полиморфизм не следует использовать в качестве самостоятельного диагностического и/или прогностического маркера наследственной тромбофилии и/или тромботической предрасположенности.

2. Исследование аллельного полиморфизма G1691A гена фактора V (FV Leiden) не позволяет получить дополнительной информации в плане прогнозирования степени выраженности геморрагических проявлений и/или изменений основных лабораторных характеристик фактора Виллебранда (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C).

3. В связи с достаточно высокой частотой встречаемости гетерозиготного варианта мутации G20210A гена протромбина у пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа и выраженными проявлениями геморрагического диатеза, данный полиморфизм не следует использовать в качестве самостоятельного диагностического и/или прогностического маркера наследственной тромбофилии и/или тромботической предрасположенности.

4. Исследование аллельного полиморфизма G20210A гена протромбина не позволяет получить дополнительной информации в плане прогнозирования степени выраженности геморрагических проявлений и/или изменений основных лабораторных характеристик фактора Виллебранда (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C).

5. В связи с одинаково высокой частотой встречаемости полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов GPIIb (1a/1b), гена интегрина α -2 GPIa (C807T), GPIb (A1/A2), как среди пациенток с болезнью Виллебранда 1 типа, так и среди здоровых доноров крови и отсутствия у них видимого влияния, как на лабораторные характеристики клоттинговой активности фактора Виллебранда, так и на степень выраженности геморрагических проявлений у пациенток с болезнью Виллебранда, исследование данных полиморфизмов не имеет клинического значения в плане стратификации тромботических и/или геморрагических рисков.

6. Использование геморрагического опросника позволяет достаточно эффективно проводить скрининг лиц в плане выявления возможного геморрагического диатеза, обусловленного болезнью Виллебранда 1 типа.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чернова Е.В. Генетика и молекулярная биология болезни Виллебранда / Е.В. Чернова, А.В. Колосков О.И. Филиппова, М.Ю. Васильева // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии»: Форекс Принт. – Киров, 2017. – 270 с.

2. Колосков А.В. Изучение геморрагического анамнеза как основополагающий этап диагностики патологии свертывающей системы крови / А.В. Колосков, О.И. Филиппова, М.Ю. Васильева, Е.В. Чернова // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии»: Форекс Принт. – Киров, 2017. – 270 с.

3. Чернова Е.В. Фактор Виллебранда / Е.В. Чернова // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 73–80.

4. Колосков А.В. Клиническое значение полиморфизма генов фактора V и протромбина / А.В. Колосков, Е.В. Чернова // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т.63. – №3. – С. 250-257.

5. Чернова Е.В. Полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов GPIA, GPIb и GPIIb у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа / Е.В. Чернова, А.В. Колосков // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2019. – Т.78. – № 2. – С. 63-67.

6. Колосков А.В. Распространенность мутации гена фактора V (Лейден) и гена протромбина G20210A у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа / А.В. Колосков, Е.В. Чернова // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – №1. – С. 60–65.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

vWF:Ag-антиген фактора Виллебранда

vWF:RCo -ристоцетин кофакторная активность фактора Виллебранда

FVIII:C- прокоагулянтная активность фактора VIII

GPIIIa-гликопротеин IIIa

GP1a-гликопротеин Ia

GP1b-гликопротеин Ib

FV Leiden- ген фактора V мутация Лейден

G- гуанин

A-аденин